

02.3.2004

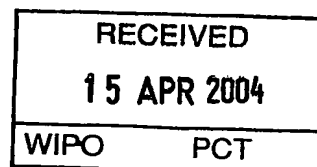
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 3月 3日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-055220
[ST. 10/C]: [JP2003-055220]



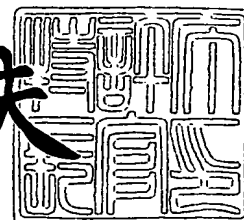
出 願 人
Applicant(s): 明治製菓株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PF0683

【提出日】 平成15年 3月 3日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田 5-3-1 明治製菓株式会社 ヘ
 ルス・バイオ研究所内

 【氏名】 中村 博文

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田 5-3-1 明治製菓株式会社 ヘ
 ルス・バイオ研究所内

 【氏名】 窪田 英俊

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都府中市幸町 3-5-8 東京農工大学 農学部内

 【氏名】 川合 伸也

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都府中市幸町 3-5-8 東京農工大学 農学部内

 【氏名】 光成 崇

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都府中市幸町 3-5-8 東京農工大学 農学部内

 【氏名】 福富 大介

【特許出願人】

 【識別番号】 000006091

 【氏名又は名称】 明治製菓株式会社

 【代表者】 北里 一郎

 【電話番号】 03-3273-3357

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008305

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フラクトオリゴ糖蓄積トランスジェニック植物およびその作出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含んでなる遺伝子構築物で植物を形質転換し、フラクトオリゴ糖を蓄積するトランスジェニック植物を作出する方法。

【請求項2】 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、アスペルギルス (Aspergillus) 属由来、ペニシリウム (Penicillium) 属由来、またはスコプラリオプシス (Scopulariopsis) 属由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 由来である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、下記からなる群より選択される、請求項1に記載の方法：

- (a) 配列番号1で表わされる塩基配列を含んでなる遺伝子、
- (b) 前記(a)の塩基配列において、1個もしくは複数個の塩基が欠失、置換、挿入、削減もしくは付加された塩基配列を含んでなり、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項5】 遺伝子構築物が、構成的プロモーター、器官特異的プロモーターまたは生育ステージ特異的プロモーターに機能し得るように連結された β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含んでなる、請求項1～4に記載の方法。

【請求項6】 プロモーターが、下記からなる群より選択される、請求項5に記載の方法：

- (i) CaMV35Sプロモーター、
- (ii) サツマイモのスポラミンAプロモーター、および
- (iii) サツマイモのスポラミンBプロモーター。

【請求項 7】トランスジェニック植物が、双子葉植物または単子葉植物である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】トランスジェニック植物が、ナス科、アカザ科またはイネ科である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】トランスジェニック植物が、タバコ属、フダンソウ属またはサトウキビ属である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法により作出されたトランスジェニック植物およびその子孫植物。

【請求項 11】請求項 10 に記載のトランスジェニック植物またはその子孫植物の種子。

【請求項 12】請求項 10 または 11 に記載の植物、子孫植物もしくはそれらの種子を栽培し、植物体内に蓄積されたフラクトオリゴ糖を採取する工程を含んでなる、フラクトオリゴ糖の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、フラクトオリゴ糖を高純度かつ高含量で蓄積するトランスジェニック植物およびその作出方法に関する。より具体的には、カビ由来の β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を植物で発現させ、1-kestose、ニストース若しくは 1-フルクトフラノシルニストースの少なくとも 1 つの成分を蓄積するトランスジェニック植物の作出方法に関する。

【0002】

【従来技術】

フラクトオリゴ糖は、スクロースにフルクトースが β 2 \rightarrow 1 結合で結合したオリゴ糖類であり、その還元末端はグルコースである。フラクトオリゴ糖は、難う蝕性や、ビフィズス菌増殖促進作用、コレステロールなどの脂質代謝改善作用、免疫調節作用など様々な生理機能を有することが明らかになっており、機能性食品素材として産業上極めて有用である。フラクトオリゴ糖は、自然界では広く植物に分布しており、例えばアスパラガス、タマネギ、キクイモ、蜂蜜などに含ま

れていることが知られているが、その含有量は低く、タマネギで $2.8 \text{ g} / 100 \text{ g}$ 程度といわれている。

【0003】

近年、微生物由来の β -フルクトフラノシダーゼの転移反応を利用して、スクロースからフラクトオリゴ糖を大量に製造する技術が確立され、工業的に生産されている。工業的に使用されているカビ由来の β -フルクトフラノシダーゼは、転移活性が高いことや異性体がほとんど生成しないことが特徴であり、スクロースを基質とした酵素反応を行うことにより、重合度 3～6 のフラクトオリゴ糖を効率よく生成する。さらに、カビ由来の β -フルクトフラノシダーゼを改変することにより、親 β -フルクトフラノシダーゼにより生成するフラクトオリゴ糖の組成と異なる組成のフラクトオリゴ糖を生成する β -フルクトフラノシダーゼ変異体が得られている [国際公開第 97/34004 号パンフレット (特許文献 1)]。

【0004】

一方、植物に特定の遺伝子を導入して形質転換させる技術は、アグロバクテリウム・テュメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) を用いてタバコに遺伝子が導入されて以来、多くの有用形質を付与した作物が作出されてきた。また、植物に有用成分を蓄積させる試みも行われ、フラクトオリゴ糖を植物に蓄積させた例も公知となっている [国際公開第 96/01904 号パンフレット (特許文献 2)、国際公開第 03/00854 号パンフレット (特許文献 3)、“Nature Biotechnology” 16 巻, 1998 年, p. 843-846 (非特許文献 1)]。

【0005】

しかしながら、前記の先行例におけるフラクトオリゴ糖の生成量は微量であり、また、フラクトオリゴ糖の異性体、例えば 1-kestose の異性体である neo-kestose や 6-kestose が生成されている [特許文献 2, p. 56-59, 図 17A・図 17B、特許文献 3]。また、貯蔵糖がスクロースであるビートの形質転換体の根における蓄積量は、1-kestose が 3.7% ($73.8 \mu\text{mol} / \text{g FW}$) 程度である [非特許文献 1]。

【0006】

【特許文献1】

国際公開第97/34004号パンフレット

【特許文献2】

国際公開第96/01904号パンフレット

【特許文献3】

国際公開第03/00854号パンフレット

【非特許文献1】

“Nature Biotechnology” 16巻, 1998年, p. 843-846

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

微生物由来の β -フルクトフラノシダーゼを用いて発酵生産を行う従来のフラクトオリゴ糖製造法は、製造コストが高いばかりでなく、単糖（グルコース）が副生産物として生成されるため、オリゴ糖の特長である整腸作用・難う蝕性・低カロリー等の生理的機能を損なう問題があった。そのため、クロマト分画等により単糖類を除去する工程が必要となり、さらに製造コストを増大することも問題であった。これらの問題点を解決するために、効率よく、より高純度のフラクトオリゴ糖を生成させる方法が望まれている。

植物にフラクトオリゴ糖を蓄積させる方法も試みられているが、高純度のフラクトオリゴ糖、特に、その構成成分である1-kestose、nystose、1-fructofuranosyl nystoseを高含量でかつ高純度に蓄積するトランスジェニック植物はいまだに報告されていない。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、これまでに植物における発現の報告がされていなかったアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来の β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を用いて、種々の検討を重ね、植物の形質転換が可能な遺伝子構築物を調製した。さらに、この遺伝子構築物を用いて植物を

形質転換し、植物体として再生させることにより、フラクトオリゴ糖を蓄積できるトランスジェニック植物を作出した。通常、タバコはフラクトオリゴ糖を生成しないが、本発明のトランスジェニック植物の一例であるタバコは約 $3 \sim 4 \mu\text{m}$ o 1/g もの 1-ケストースを生産、蓄積するという、これまでにない特性を有する。

【0009】

したがって、本発明は、スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼを含んでなる遺伝子構築物で植物を形質転換し、フラクトオリゴ糖を蓄積するトランスジェニック植物を作出する方法、並びに前記方法で作出されたトランスジェニック植物、その子孫植物、およびそれらの種子を提供するものである。さらに、本発明のトランスジェニック植物、その子孫植物、およびそれらの種子を用いたフラクトオリゴ糖の製造方法を提供するものである。

【0010】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含んでなる遺伝子構築物で植物を形質転換し、フラクトオリゴ糖を蓄積するトランスジェニック植物を作出する方法。

(2) β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、アスペルギルス (Aspergillus) 属由来、ペニシリウム (Penicillium) 属由来、またはスコプラリオプシス (Scopulariopsis) 属由来である、(1) に記載の方法。

(3) β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) 由来である、(2) に記載の方法。

(4) β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子が、下記からなる群より選択される、(1) に記載の方法：

(a) 配列番号 1 で表わされる塩基配列を含んでなる遺伝子、

(b) 前記 (a) の塩基配列において、1 個もしくは複数個の塩基が欠失、置

換、挿入、削減もしくは付加された塩基配列を含んでなり、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有するタンパク質をコードする遺伝子。

(5) 遺伝子構築物が、構成的プロモーター、器官特異的プロモーターまたは生育ステージ特異的プロモーターに機能し得るように連結された β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含んでなる、(1)～(4)に記載の方法。

(6) プロモーターが、下記からなる群より選択される、(5)に記載の方法：

(i) CaMV 35S プロモーター、

(ii) サツマイモのスポラミンAプロモーター、および

(iii) サツマイモのスポラミンBプロモーター。

(7) トランスジェニック植物が、双子葉植物または単子葉植物である、(1)～(6)のいずれか一項に記載の方法。

(8) トランスジェニック植物が、ナス科、アカザ科またはイネ科である、(7)に記載の方法。

(9) トランスジェニック植物が、タバコ属、フダンソウ属またはサトウキビ属である、(8)に記載の方法。

(10) (1)～(9)のいずれか一項に記載の方法により作出されたトランスジェニック植物およびその子孫植物。

(11) (10)に記載のトランスジェニック植物またはその子孫植物の種子。

(12) (10)または(11)に記載の植物、子孫植物もしくはそれらの種子を栽培し、植物体内に蓄積されたフラクトオリゴ糖を採取する工程を含んでなる、フラクトオリゴ糖の製造法。

【0011】

【発明の実施の形態】

β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子

本発明における β -フルクトフラノシダーゼとは、スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する酵素である。

【0012】

本発明におけるフラクトオリゴ糖とは、スクロースにフルクトースが β 2 \rightarrow 1結合で重合した重合度3以上のフルクタンであり、還元末端にはグルコースが結

合している。重合度3のフルクタンが1-kestose、重合度4のフルクタンがニストース、重合度5のフルクタンが1-フルクトフラノシルニストースである。本発明では、特に重合度3～5のフラクトオリゴ糖を効率よく生産することを目的としている。

【0013】

そこで、本発明では、 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子の選定が重要となる。カビ由来の β -フルクトフラノシダーゼは、植物や細菌由来のフラクトオリゴ糖生成酵素と比較して、比活性が高く、広いpH領域と温度領域で作用するために効率よくフラクトオリゴ糖を生成し、異性体の生成がほとんど見られないという好ましい特徴を有する。

【0014】

本発明における好適な β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子として、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属由来、ペニシリウム (*Penicillium*) 属由来、またはスコプラリオプシス (*Scopulariopsis*) 属由来の遺伝子が挙げられる。より好ましくは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来の遺伝子が挙げられる。具体的な例として、国際公開第97/34004号パンフレットに記載のアスペルギルス・ニガー ACE-2-1 (ATCC 20611) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号2)、ペニシリウム・ロッケフォルチ (IAM 7254) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号12)、およびスコプラリオプシス・プレビカウリス (IFO 4843) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号14)、国際公開第99/13059号パンフレットに記載のペニシリウム・ロッケフォルチ (IAM 7254) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号2)、およびスコプラリオプシス・プレビカウリス (IFO 4843) 由来の酵素をコードする遺伝子 (同パンフレット配列番号4) が挙げられる。

【0015】

また、 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子は、下記からなる群より選択される：

(a) 配列番号 1 で表わされる塩基配列を含んでなる遺伝子、

(b) 前記 (a) の塩基配列において、1 個もしくは複数個の塩基が欠失、置換、挿入、削減もしくは付加された塩基配列を含んでなり、かつスクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有するタンパク質をコードする遺伝子。

前記 (a) の塩基配列において、欠失、置換、挿入、削減もしくは付加されてもよい塩基の数は、具体的には 1 ~ 60 個、好ましくは 1 ~ 30 個、より好ましくは 1 ~ 15 個である。

より具体的には、国際公開第 97/34004 号パンフレットの実施例 D1 ~ D11 に記載されている方法で得られる変異体をコードする遺伝子が挙げられる。

【0016】

β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子は、好ましくは国際公開第 97/34004 号パンフレットまたは国際公開第 99/13059 号パンフレットに記載の方法に従って調製することができる。より具体的には、国際公開第 97/34004 号パンフレット実施例 A、実施例 D1 を参照してプラスミド pAN120 (同パンフレット図 6) を調製した後、BamHI で消化することにより、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) ATCC 20611 株由来の β -フルクトフラノシダーゼ (FFase) cDNA を得ることができる。

【0017】

遺伝子構築物

上記のようにして得られる β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子、またはそれを含有するプラスミドを基に、さらに植物体で発現可能な遺伝子構築物 (植物プラスミドまたはバイナリーベクター) を調製することができる。

【0018】

本発明に使用される遺伝子構築物は、 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子、植物体内で機能する適切なプロモーターの他に、適切なターミネーター (例えば、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネーター、CMV35Sターミネーター等)、発現制御に有用なエレメント、形質転換体を選抜するための適切なマ

ーカー遺伝子（例えば、カナマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、G418耐性などの薬剤耐性遺伝子）を含むことができる。

【0019】

植物体内で機能する適切なプロモーターとは、例えば構成的プロモーター、器官特異的プロモーターまたは生育ステージ特異的プロモーター等が挙げられる。構成的プロモーターとは、植物の器官や生育条件等に関係なく、常に一定量発現させるプロモーターであり、例えばカリフラワー・モザイク・ウイルス・35S・プロモーター等が挙げられる。器官特異的プロモーターとは、特定の器官（例えば、根、葉、茎など）で特異的に発現させるプロモーターであり、スボラミンAプロモーター、スボラミンBプロモーター等が挙げられる。生育ステージ特異的プロモーターとは、特定の生育段階（例えば、発芽期、結実期など）で特異的に発現させるプロモーターである。これらプロモーターは、使用する宿主、発現させるべき器官・組織、生育ステージ等に応じて適切に選択することができる。また、本発明に使用されるプロモーターは、植物内に導入した場合に、RNAポリメラーゼが特異的に結合してその下流方向に転写をはじめることができるプロモーターを意味する。好ましくは以下の群から選択される：

- (i) カリフラワー・モザイク・ウイルス・35S・プロモーター (CaMV 35Sプロモーター)、
- (ii) サツマイモのスボラミンAプロモーター、および
- (iii) サツマイモのスボラミンBプロモーター。

【0020】

例えば、塊根中で β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を発現させるには、サツマイモのスボラミンプロモーターが好ましい。サツマイモ (*Ipomoea batatas*) は貯蔵タンパク質としてスボラミンを産生し、これはサツマイモ塊根の全可溶性タンパク質の60～80%を占めている。このスボラミンをコードする遺伝子は多重遺伝子族を形成しており、その相同性からスボラミンA遺伝子とスボラミンB遺伝子に分類されている。いずれの遺伝子も塊根で特異的に発現するプロモーターを持つ。また、スボラミンプロモーターは、糖類、特にスクロースで誘導される特徴を有する。

【0021】

本発明に使用される遺伝子構築物の構築手順は特に限定されるものではないが、例えば以下のようにして調製することができる。すなわち、アスペルギルス・ニガー由来の β -フルクトフラノシダーゼ cDNA を pBI121 (クローンテック社製) の CaMV 35S プロモーターの下流に存在する BamHI 部位に挿入し、必要に応じて β -グルクロニダーゼ 遺伝子を除去してバイナリーベクターを得ることができる。該ベクターは、 β -フルクトフラノシダーゼ 遺伝子上流に CaMV 35S プロモーター、下流には Ti プラスミドのヘパリン合成酵素 遺伝子のターミネーターが連結されているので、該ベクターの β -フルクトフラノシダーゼ 遺伝子は植物での発現が可能となる。また、該ベクターにはカナマイシン耐性遺伝子が存在し、大腸菌等の微生物や植物においてカナマイシン耐性を付与できる。

【0022】

 β -フルクトフラノシダーゼ 遺伝子の植物体への導入、発現

本発明で使用される植物体への遺伝子導入法は特に限定されず、植物細胞または植物体への遺伝子導入法として当業者に公知のいずれの方法を使用してもよい。例えば、本発明の好適な実施態様の一つとして、遺伝子構築物を植物に導入するためにアグロバクテリウムが用いられる。植物を形質転換するためにアグロバクテリウムを用いる場合、導入すべき塩基配列に隣接する位置に T-DNA 領域のボーダー配列を連結させることができる。このような T-DNA を用いる形質転換ベクターの適切な構築は当業者に公知である。

別の実施態様として、カルシウム、ポリエチレングリコールを使用した導入法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等が挙げられる。

【0023】

また、 β -フルクトフラノシダーゼ をコードする遺伝子を導入する植物は、特に限定されないが、好ましくは双子葉植物、単子葉植物である。より好ましくは、双子葉植物ではナス科、アカザ科、単子葉植物ではイネ科が挙げられる。さらに好ましくは、ナス科タバコ属、アカザ科フダンソウ属、イネ科サトウキビ属が挙げられる。特により好ましくは、タバコ (Nicotiana tabacu

m)、ビート(サトウダイコン:Beta vulgaris var. rapa, テーブルビート:Beta vulgaris var. rubra, フダンソウ:Beta vulgaris var. vulgaris, ベタ・ウルガリス・アルバ:Beta vulgaris var. alba) またはサトウキビ(Saccharum officinarum)、またはこれらのプロトプラストが挙げられる。ビートやサトウキビは、スクロースを貯蔵する植物であり、それらのスクロース貯蔵器官、組織において β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子を発現させることにより、フラクトオリゴ糖の生産において特に有利な効果が得られる。

【0024】

本発明における β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含む遺伝子構築物の植物の染色体へ導入する方法は、例えば、以下のようなリーフディスク法(Horshら, Science, 227, 1229-1232, 1985)で行うのが好ましい。アグロバクテリウム・テュメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)をストレプトマイシン(streptomycin)を添加したYEP液体培地において、例えば28℃で8~9時間振盪培養した菌体を、常法に従い、プロトプラスト(コンピテントセル)を調製する。 β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を含む遺伝子構築物を前述のコンピテントセルに加え、緩やかに混ぜた後に氷上に静置する。続いて、2mm電極幅キュベット(Gene Pulser/E. coli Pulser™ Cuvette, BIO-RAD社製)に移し、エレクトロポレーション装置(例えば、GENE PULSER(R) II system, BIO-RAD社製)で取扱説明書に従ってエレクトロポレーションを行う。処理後の試料にYEP液体培地を加えて28℃で2~4時間静置培養後、抗生物質(例えば、カナマイシン)を含有するLB培地で培養して形質転換体を得ることができる。

【0025】

この形質転換体をYEP液体培地で培養し、この培養液を無菌培養した植物の葉から採取したリーフディスクに漬けた後に、莖葉分化培地で培養してカルスを

形成、増殖させる。植物用の茎葉分化培地としては、例えばMS培地 (MurashigeとSkoog, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497, 1962) 等、公知の培地を使用することができる。その後を選択用の茎葉分化培地を用いて、カルスの選択を行えばよい。例えば、カナマイシン 50 mg/L ~ 200 mg/L を加えたものを使用すればよい。

さらに、植物体を再分化させるには、MS培地等の公知の培地にカナマイシン等を加えた根分化培地を用いて培養すればよい。発根した幼植物体を移植して栽培することにより植物体 (トランスジェニック植物) を得ることができる。その種子を栽培し、その子孫植物およびその種子を得ることができる。

【0026】

トランスジェニック植物体中のフラクトオリゴ糖の採取・分析

本発明のトランスジェニック植物体内のフラクトオリゴ糖を採取・分析する方法として、例えば以下のように行うことができる。植物体の各器官 (根、茎、葉等) を液体窒素中で粉碎して一定量を秤量し、蒸留水を所定量加えて十分に攪拌する。遠心分離により上清を回収し、薄層クロマトグラフィーまたは高速液体クロマトグラフィー等公知の方法で分析することにより、植物体におけるフラクトオリゴ糖の生成・蓄積を確認することができる。

【0027】

【実施例】

以下に本発明の具体的な実施例を示すが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0028】

実施例 1. タバコへの β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の導入

(1) CaMV 35S プロモーターを含むバイナリーベクターの調製

国際公開第 97/34004 号パンフレット実施例 A、実施例 D1 を参照して調製したプラスミド pAN120 (同パンフレット図 6) を BamHI で消化し、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) ATCC 20611 株由来の β -フルクトフラノシダーゼ cDNA (配列番号 1) を含む約 1.9 kb の BamHI - BamHI 断片を得た。pBI121 (Clonet

ech社製)をBamHIで消化し、前記のFFase cDNAを含むBamHI-BamHI断片とDNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造社製)を用いて連結し、pBI121のCaMV35Sプロモーターの下流にFFase遺伝子が挿入されたバイナリーベクターを作製した。

【0029】

(2) サツマイモのスポラミンAプロモーターを含むバイナリーベクターの調製

サツマイモのスポラミンAプロモーターをHattori, T., and Nakamura, K, "Plant Mol. Biol.", 11巻, 1988年, p. 417-426に記載の方法に従って調製した。得られたスポラミンAプロモーターをさらにHindIIIで消化し、スポラミンAプロモーターのHindIII-HindIII断片(約1kbp)を得た。

pBI101 (Clontech社製)をSmaI、SacIで消化し、平滑化して自己連結させることにより、 β -グルクロニダーゼ遺伝子を除去したプラスミドpBI101-GUSを得た。

pBI101-GUSをHindIIIで消化し、前記のスポラミンAプロモーターのHindIII-HindIII断片とDNA Ligation Kit Ver. 2を用いて連結した。続けて、連結したプラスミドをBamHIで消化し、実施例1の(1)と同様に調製したFFase cDNAを含むBamHI-BamHI断片とDNA Ligation Kit Ver. 2を用いて連結し、pBI101-GUSのHindIII部位にスポラミンAプロモーターが、その下流にあるBamHI部位にFFase遺伝子が挿入されたバイナリーベクターを作製した。

【0030】

(3) サツマイモのスポラミンBプロモーターを含むベクターの調製

サツマイモのスポラミンBプロモーターをHattori, T., and Nakamura, K, "Plant Mol. Biol.", 11巻, 1988年, p. 417-426に記載の方法に従って調製した。得られたスポラミンBプロモーターをさらにHindIIIおよびPstIで消化し、スポラミンBプロモーターのHindIII-PstI断片(約0.75kbp)を得た。得られた

断片を、pBlueScript KS (一) のマルチクローニングサイトに挿入した。得られたプラスミドをBamHIで消化し、実施例1の(1)と同様に調製したFFase cDNAを含むBamHI-BamHI断片とDNA Ligation Kit Ver. 2を用いて連結した。得られたプラスミドをHindIII、XbaIで消化し、スプラミンBプロモーターとその下流にFFase遺伝子を含む約2.7kbpの断片を得た。続いて、実施例1の(2)に記載の方法に従って調製したプラスミドpBI101-GUSをHindIIIおよびXbaIで消化し、前記の約2.7kbpの断片とDNA Ligation Kit Ver. 2を用いて連結し、pBI101-GUSのHindIII-XbaI部位に、スプラミンBプロモーターとその下流にFFase遺伝子が挿入されたバイナリーベクターを作製した。

【0031】

(4) タバコへの遺伝子導入と植物体再生

アグロバクテリウム・テュメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 (プラスミド, 7巻, 1982年, p. 15) をYEP液体培地 (ストレプトマイシン添加) 250mLにおいて28℃で8~9時間振盪培養した (O. D. 600=0.5まで)。

【0032】

YEP液体培地組成 (g/100mL)

バクトーペプトン	1 g
バクトーイーストエキストラクト	1 g
塩化ナトリウム	0.5 g

【0033】

遠心分離した菌体に氷冷10%グリセロール溶液 (9.31% (W/V) スクロース、10% (V/V) グリセロール、1mmol/L塩化マグネシウム) 200mLを加えて懸濁する操作を3回繰り返した。さらに、氷冷10%グリセロール溶液20~30mLを加え懸濁して遠心分離し、得られた菌体に氷冷10%グリセロール溶液400~600μLを加えて懸濁し、液体窒素で瞬間凍結してコンピテントセルとした。

【0034】

実施例1の(1)、(2)、(3)で調製した3種のバイナリーベクターDNA各1 μ Lを、それぞれ前記コンピテントセル50 μ Lに加え、緩やかに混ぜた後30秒以上氷上に静置後、2mm電極幅キュベット (Gene Pulser / *E. coli* Pulser™ Cuvette, BIO-RAD社製) に移し、エレクトロポレーション装置 (GENE PULSER (R) II system, BIO-RAD社製) で取扱説明書に従ってエレクトロポレーションを行った。処理後の各試料にYEP液体培地1mLを加えて28℃で2~4時間静置培養した後、カナマイシンを含有するLB培地で培養して、3種のバイナリーベクターDNAの各々で形質転換された形質転換体を得た。

【0035】

LB培地組成 (g/100mL)

バクトートリプトン	1 g
バクトーイーストエキストラクト	0.5 g
塩化ナトリウム	0.5 g
(カナマイシン	15 μ g/mL)

【0036】

得られた各形質転換体をYEP液体培地において28℃で振盪培養して培養液を得た (O. D. 550=1.0まで培養)。無菌培養したタバコ (*Nicotiana tabacum* Samsun NN株) の無菌葉から切り出したリーフディスク (5~7mm四方) をMS液体培地に浸し、前記培養液を加え、30分間静置した。

【0037】

MS培地 (mg/L) (pH5.7)

NH ₄ NO ₃	1,650
KNO ₃	1,900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170

H ₃ BO ₃	6. 2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22. 32
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8. 6
KI	0. 83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0. 25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0. 025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0. 025
EDTA-Na ₂	37. 3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27. 8
ミオイノシトール	100
グリシン	2. 0
ピリドキシン塩酸塩	0. 5
ニコチン酸	0. 5
チアミン塩酸塩	0. 1
スクロース	30, 000
寒天 (液体培地調製時は添加しない)	9

【0038】

前記リーフディスクから、余分な培養液を滅菌済みの濾紙で除去し、MSシュート分化培地 (ストレプトマイシン 15 mg/L、カナマイシン 150 mg/L 添加MS培地) に葉の裏面を上にして植え、25℃暗所にて3～4日間培養した。リーフディスクをシュート分化培地 (カルベニシリン 500 mg/L、カナマイシン 150 mg/L 含有MS培地) に植え替え、25℃で16時間明所/8時間暗所で培養した。3～4週間で新しいシュート分化培地に植え替え、シュートが1 cmくらいまで伸びた後、シュートのみをMSシュート分化培地 (カナマイシン 100 mg/L) に植え替え、完全な植物体を得た。その後は、MS寒天培地 (成長ホルモン添加無し) に植え継いだ。

【0039】

(5) タバコ植物体へのβ-フルクトフラノシダーゼ遺伝子導入の確認

(5a) タバコ植物体からの全DNA単離

実施例1の(1)、(2)、(3)のバイナリーベクターを用いて各々得られたタバコ植物体の葉組織50~100mgを採取し、-80℃で冷凍した後、100μLの抽出用緩衝液を加えて解凍した。

【0040】

抽出用緩衝液

Urea	5mol/L
2-メルカプトエタノール	10mmol/L
Phenol	5% (v/v)
滅菌水	1容量
2×抽出用緩衝液ストック溶液 (組成は下記)	1容量
NaCl	0.6mol/L
Tris-HCl (pH7.5)	0.1mol/L
EDTA (pH8.0)	40mmol/L
SDS	1% (w/v)

【0041】

超音波破碎機で葉組織を1~2分間磨碎した後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)を用いて、添付の取扱説明書に記載の方法に従ってタバコ植物体の全DNAを得た。

【0042】

(5b) PCR法による導入遺伝子の検出

β-フルクトフラノシダーゼ遺伝子を導入した領域の上流・下流となる領域の配列をもとにプライマーを設計した。

実施例1の(1)のバイナリーベクターを用いて得られた植物体の検出用プライマーとして、CaMV35Sプロモーター領域3'側、およびnos-Ter領域5'側の配列をもとに、以下のプライマーを設計した。

【0043】

CaMV35S:

5'-TTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCA-3' (配列番号2)

n o s - T e r :

5 ' - A T A A T T T A T C C T A G T T T G C G C G C T A T A - 3 ' (配列
番号3)

【0044】

実施例1の(2)のバイナリーベクターを用いて得られた植物体の検出用プライマーとして、上流側にサツマイモ由来スポラミンAプロモーターを調製する際に用いたプライマー(SPOA1S)、下流側に β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子配列の下流領域をもとに設計したプライマー(FFaseRev)を使用した。

【0045】

S P O A 1 S :

5 ' - T A A G C T T A A T T T A C T A A T T T G G G G T T T T A C - 3 ' (配列
番号4)

F F a s e R e v :

5 ' - A G A G C C C C T C C G A C A C G G A G A C A T T C C - 3 ' (配列
番号5)

【0046】

実施例1の(3)のバイナリーベクターを用いて得られた植物体の検出用プライマーとして、上流側にサツマイモ由来スポラミンBプロモーターを調製する際に用いたプライマー(SPOB1S2)、下流側に β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子配列の下流領域をもとに設計したプライマー(前記のFFaseRev: 配列番号5)を使用した。

S P O B 1 S 2 :

5 ' - T A A G C T T T A G G T T C A C T C A C C T T A A G T T T C - 3 ' (配列
番号6)

【0047】

実施例1の(5a)で調製した、各植物体の全DNAを鋳型として用いてPCR反応を行い、増幅された遺伝子断片を観察した。実施例1の(1)のバイナリーベクターを用いて得られた植物体の全DNAからは、 β -フルクトフラノシダー

ーゼ遺伝子 (約 1.9 kbp) + GUS 遺伝子 (約 2 kbp) の合計約 4 kbp の断片が確認された。また、実施例 1 の (2) または (3) のバイナリーベクターを用いて得られた各植物体の全 DNA からは、スポラミンプロモーター (約 1 kbp) + β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子 (約 1.9 kbp) の合計約 3 kbp の断片がそれぞれ確認された。

【0048】

実施例 2. タバコ植物体内のフラクトオリゴ糖の分析

実施例 1 の (3) のバイナリーベクター (サツマイモのスポラミン B プロモーターを含有する) を用いて、実施例 1 の (4) に記載の方法で得られたタバコ形質転換体の茎中のフラクトオリゴ糖を以下のように分析した。同様の方法で、形質転換を行っていないタバコ親株についても分析を行った。

30 cm 以上に成長したタバコ植物体の茎下部約 1.5 g 生重量を液体窒素存在下で磨碎し、純水 1.5 mL を加えて攪拌した。80℃～85℃で 1.5 時間保温後、遠心分離した上清を分析に供した。高速液体クロマトグラフィー分析は、検出器: 示差屈折計 410 (Waters 社製)、カラム: ハイパーリクロカート 250-4 リクロスフェア 100 NH₂ 4 mm I. D. × 250 mm (関東化学社製) を用いて行い、分析条件は、移動相: アセトニトリル: 水 = 72:28、流速: 毎分 1.0 mL、温度: 40℃で行った。その結果を表 1 に示した。

【0049】

【表 1】

	タバコ (親株) ($\mu\text{mol/g FW}$)	タバコ (本発明のトランス ジェニック植物) ($\mu\text{mol/g FW}$)
フルクトース	1.8	3.0
グルコース	4.8	8.9
スクロース	15.7	9.8
1-kestose	0.0	3.6
ニストース	0.0	0.9

【0050】

フラクトオリゴ糖を全く生産しないタバコの茎中において、本発明の方法で形質転換されたタバコ (トランスジェニック植物) はフラクトオリゴ糖の成分である 1-kestose (GF_2) およびニストース (GF_3) を顕著に生成・蓄積していることが確認された。

【0051】

【発明の効果】

本発明により、フラクトオリゴ糖を植物体内に高含量かつ高純度で蓄積させたトランスジェニック植物が得られ、フラクトオリゴ糖を効率よく産生することができる。

【0052】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> Transgenic plants modified to accumulate fructooligosaccharides and production thereof

<130> PF0683

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1965

<212> DNA

<213> *Aspergillus niger* ACE-2-1(ATCC20611)

<400> 1

atgaagctca ccactaccac cctggcgctc gccaccggcg cagcagcagc agaagcctca 60

taccacctgg acaccacggc cccgccgccg accaacctca gcacctccc caacaacacc 120

ctcttccacg tgtggcggcc gcgcgcgcac atcctgcccg ccgagggcca gatcggcgac 180

ccctgcgcgc actacaccga cccatccacc ggcctcttcc acgtggggtt cctgcacgac 240

ggggacggca tcgcgggcgc caccacggcc aacctggcca cctacaccga tacctccgat 300

aacgggagct tcctgatcca gccgggcggg aagaacgacc ccgtcgccgt gttcgacggc 360

gccgtcatcc ccgtcggcgt caacaacacc cccaccttac tctacacctc cgtctccttc 420

ctgcccaccc actggtccat cccctacacc cgcggcagcg agacgcagtc gttggccgtc 480

gcgcgcgacg gcggccgccg cttcgacaag ctcgaccagg gccccgcat cgccgaccac 540

cccttcgccg tcgacgtcac cgccttccgc gatccgtttg tcttccgcag tgccaagttg 600

gatgtgctgc tgtcgttgga tgaggaggtg gcgcggaatg agacggccgt gcagcaggcc 660

gtcgatggct ggaccgagaa gaacgcccc tggtatgtcg cggctctctgg cggggtgcac 720

ggcgtcgggc ccgcgcagtt cctctaccgc cagaacggcg ggaacgcttc cgagttccag 780

tactgggagt acctcgggga gtggtggcag gaggcgacca actccagctg gggcgacgag 840

ggcacctggg ccgggcgctg ggggttcaac ttcgagacgg ggaatgtgct cttcctcacc 900

gaggagggcc atgaccccca gacgggcgag gtgttcgtca ccctcggcac ggaggggtct 960

ggcctgccaa tcgtgccgca ggtctccagt atccacgata tgctgtgggc ggcgggtgag 1020

gtcgggggtg gcagtgagca ggagggtgcc aaggtcgagt tctccccctc catggccggg 1080

tttctggact gggggttcag cgcctacgt gcggcgggca aggtgctgcc ggccagctcg 1140

gcggtgtcga agaccagcgg cgtggaggtg gatcggtatg tctcgttcgt ctggttgacg 1200

ggcgaccagt acgagcaggc ggacgggttc cccacggccc agcaggggtg gacggggtcg 1260

ctgctgctgc cgcgcgagct gaaggtgcag acggtggaga acgtcgtcga caacgagctg 1320

gtgcgcgagg agggcgtgtc gtgggtggtg ggggagtcgg acaaccagac ggccaggctg 1380

cgcacgctgg ggatcacgat cgcccgggag accaaggcgg ccctgctggc caacggctcg 1440
gtgaccgcgg aggaggaccg cacgctgcag acggcggccg tcgtgccgtt cgcgcaatcg 1500
ccgagctcca agttcttctg gctgacggcc cagctggagt tccccgcgag cgcgcgctcg 1560
tccccgtcc agtccgggtt cgaaatcctg gcgtcggagc tggagcgcac ggccatctac 1620
taccagttca gcaacgagtc gctggtcgtc gaccgcagcc agactagtgc ggcggcgccc 1680
acgaaccccg ggctggatag ctttactgag tccggcaagt tgcggttggt cgacgtgatc 1740
gagaacggcc aggagcaggt cgagacgttg gatctcactg tcgtcgtgga taacgcggtt 1800
gtcgaggtgt atgccaacgg gcgctttgcg ttgagcacct gggcgagatc gtggtacgac 1860
aactccaccc agatccgctt cttccacaac ggcgagggcg aggtgcagtt caggaatgtc 1920
tccgtgtcgg aggggctcta taacgcctgg ccggagagaa attga 1965

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer:CAMV35S

<400> 2

ttcctctata taaggaagtt catttca

27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer:nos-Ter

<400> 3

ataatttatc ctagtttgcg cgctata

27

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer:SPOA1S

<400> 4

taagcttaat ttactaattt ggggttttac

30

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer:FFaseRev

<400> 5

agagcccctc cgacacggag acattcc

27

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer:SPOB1S2

<400> 6

taagcttttag gttcactcac cttaagtttc

30

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高純度のフラクトオリゴ糖、特に、その構成成分である 1-kestose、ニストース、1-フルクトフラノシルニストースを高含量でかつ高純度に蓄積するトランスジェニック植物およびその作出方法を提供すること。

【解決手段】 スクロースをフラクトオリゴ糖に変換する作用を有する β -フルクトフラノシダーゼをコードする遺伝子を用いて、植物の形質転換が可能な遺伝子構築物を調製し、この遺伝子構築物を用いて植物を形質転換し、植物体として再生させることにより、フラクトオリゴ糖を蓄積できるトランスジェニック植物を作出した。

【選択図】 なし。

特願 2 0 0 3 - 0 5 5 2 2 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 6 0 9 1]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 3 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区京橋 2 丁目 4 番 1 6 号
氏 名	明治製菓株式会社